

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**ULOGA TRANSPOZONA U GENOMSKOM DOZIRANJU KOD VRSTE *ARABIDOPSIS***  
***THALIANA***  
**(ROLE OF TRANSPOSONS IN GENOME DOSAGE RESPONSE IN *ARABIDOPSIS***  
***THALIANA*)**

**SEMINARSKI RAD**

**Leda Ručević**

**Preddiplomski studij molekularne biologije**  
**(Undergraduate Study of Molecular Biology)**

**Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće**

**Zagreb, 2018.**

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. LTR retrotranspozoni .....	2
2.1. Umnožavanje LTR retrotranspozona .....	2
2.2. Regulacija aktivnosti LTR retrotranspozona.....	4
3. Genomska doza .....	5
3.1. Poliploidija.....	5
3.2. Triploidna barijera.....	6
4. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
4.1. Genom <i>A. thaliana</i> .....	7
4.2. Uspostava triploidne barijere u <i>A. thaliana</i> .....	8
5. Literatura.....	11
6. Sažetak.....	12
7. Summary.....	13

## 1. Uvod

Od trenutka kada su s lovačko-sakupljačkog načina života prešli na sjedilački način života, ljudima je u cilju bilo što jednostavnije i što efikasnije uzgojiti veliku količinu prehrambenih namirnica željene kakvoće. U tu svrhu su birane biljke s pogodnim svojstvima te su one međusobno križane kako bi se dobilo potomstvo sa što više pogodnih svojstava. Međutim, jako dugo vremena nije se znalo zašto je neke biljke moguće međusobno križati, a neke ne. Tek u 18. stoljeću, s prvim formalno opisanim biljnim hibridom, kreće znanstvena identifikacija hibrida (Goulet i sur., 2017). Sve do pojave molekularnih metoda, identifikacija hibrida morala se oslanjati na fenotipske usporedbe roditelja i potomaka, što je mukotrpan proces koji i dalje nije davao uvid u to kako i zašto dolazi do hibridizacije.

Molekularne metode su nam omogućile uvid u građu genoma biljaka. Pomoću njih je došlo do spoznaje da je većina biljaka poliploidna te da su razlike u razini ploidijske ono što onemogućava hibridizaciju nekih biljnih vrsta. Uz to, metodama sekvenciranja su uspješno identificirani dijelovi biljnog genoma za koje smatramo da sudjeluju u stvaranju hibridizacijskih barijera.

Ovaj seminarski rad će se osvrnuti na jedan od načina kojima biljke uspostavljaju hibridizacijske barijere. Poseban fokus je stavljen na modelni organizam *Arabidopsis thaliana*, o kojem su dostupni najrecentniji podatci o molekularnim mehanizmima koji onemogućavaju hibridizaciju.

## 2. Retrotranspozoni

Retrotranspozoni su pokretni genetički elementi koji imaju sposobnost samoumnožavanja. To im omogućuje RNA intermedijer koji se pomoću reverzne transkripcije prevodi u cDNA. Nalazimo ih u gotovo svim eukariotskim genomima, a posebno su učestali u biljaka, gdje mogu sačinjavati preko 50% jezgrinog genoma (Vicent i Casacuberta, 2017). Većina biljnih transpozona pripada LTR (eng. long terminal repeat) skupini transpozona (**Slika 1.**), koji su okarakterizirani identičnim ponavljajućim sekvencama DNA koje omeđuju kodirajuću regiju (Zhang i sur., 2014).

Da bi LTR retrotranspozon bio funkcionalan mora imati mogućnost širenja u genomu. Za to su potrebna najmanje dva gena, *gag* i *pol*. Gen *gag* kodira za poliprotein koji formira kapsulu unutar koje se odvija reverzna transkripcija. Gen *pol* kodira za proteazu, reverznu transkriptazu i integrazu (Zhang i sur., 2014).



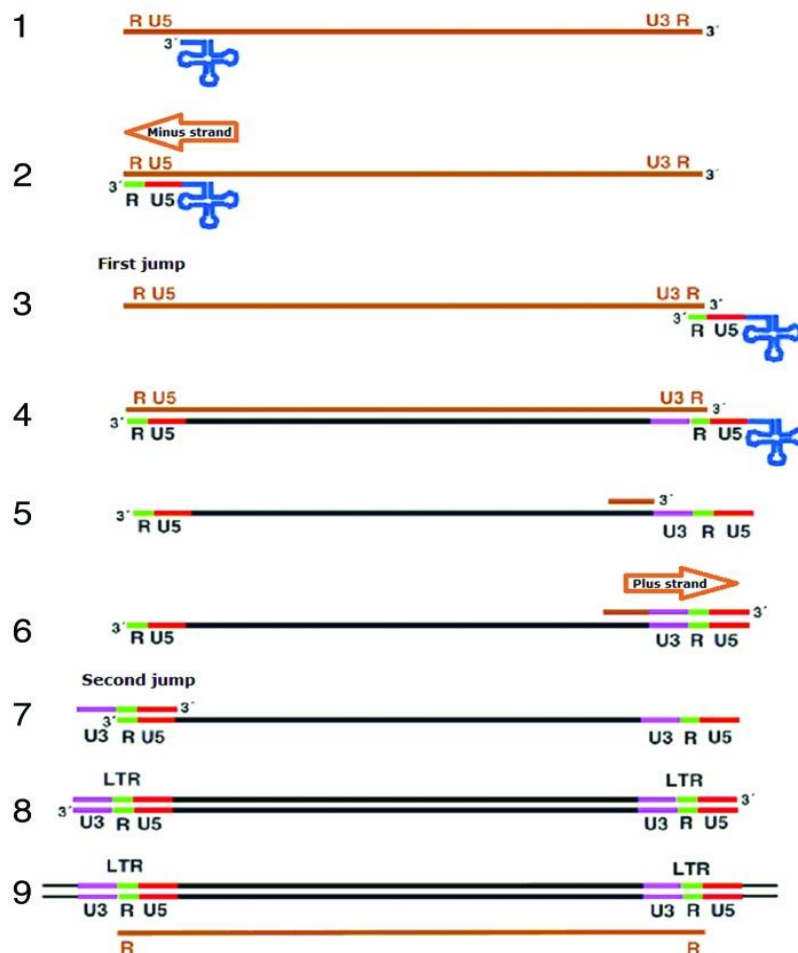
**Slika 1.** Shematski prikaz strukture LTR retrotranspozona (LTR regije su označene strelicama; PBS-mjesto vezanja početnice; PPT-purinima bogata sekvenca). Preuzeto od: Borges i sur., 2018.

### 2.1. Umnožavanje LTR retrotranspozona

Proces umnožavanja LTR retrotranspozona odvija se u nekoliko koraka (**Slika 2.**). U prvom, RNA polimeraza II domaćina prepisuje DNA retrotranspozona u mRNA, vežući se na promotor u 5' ponavljajućoj sekvenci (LTRu). Nastala mRNA se različitim strategijama translatira u dva poliproteina, s time da uvijek nastaje mnogo više proteina Gag. Unutar kapsule koju stvara protein Gag dolazi do reverzne transkripcije. Inicijacija reverzne transkripcije započinje na mjestu vezanja početnice (eng. PBS – primer binding site), koje se nalazi nizvodno od 5'-LTRa.

Nakon sinteze 5'-LTRa, novosintetizirana sekvenca cDNA se prenosi na 3'-LTR te služi kao početnica za transkripciju mRNA u jednolančanu cDNA. Simultano, mRNA biva razgrađena RNazom H, osim purinima bogate sekvence koja služi kao početnica za sintezu komplementarnog lanca cDNA.

Nakon što su oba lanca cDNA u potpunosti sintetizirana, integraza ugrađuje novonastalu kopiju retrotranspozona u nasumično mjesto u genomu (Zhang i sur., 2014).

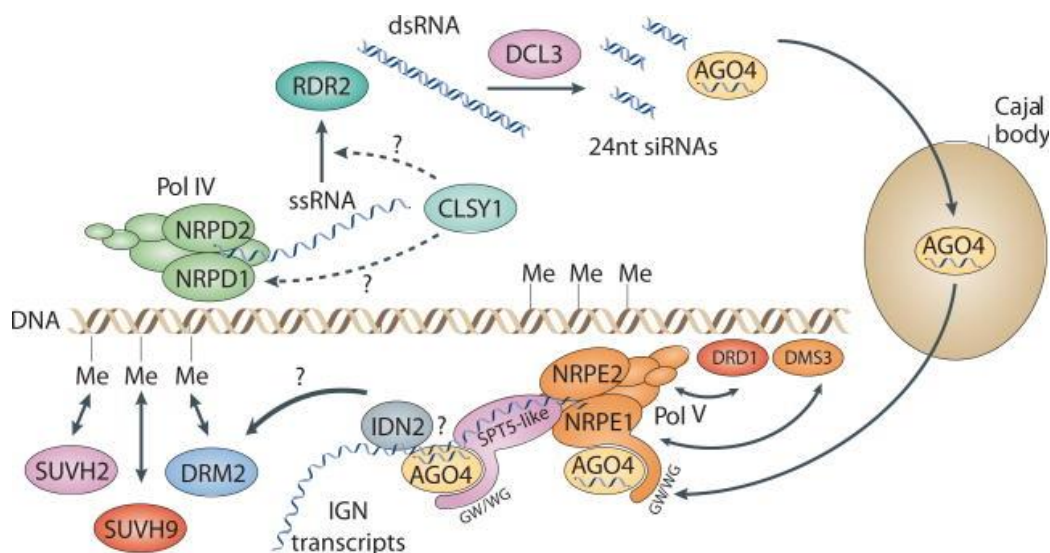


**Slika 2.** Mehanizam umnožavanja retrotranspozona. Preuzeto od: Zhang i sur., 2014.

## 2.2. Regulacija aktivnosti LTR retrotranspozona

Kako se retrotranspozoni ne bi nekontrolirano širili po genomu, organizmi su razvili načine utišavanja pokretnih genetičkih elemenata epigenetičkim promjenama. Kada je gen utišan, njegova ekspresija je drastično smanjena (Le i sur., 2015).

U biljaka se taj mehanizam utišavanja javlja u obliku metilacije citozina (mC), i to najčešće u tri sekvence: mCG, mCGH i mCHH, gdje H predstavlja adenin, citozin ili timin (Borges i sur., 2018). Gore navedena metilacija je dio procesa poznatog pod imenom RNA-vođena metilacija DNA (eng. RNA-directed DNA methylation, RdDM) (**Slika 3.**). U tom procesu dolazi do stvaranja i nakupljanja kratkih dvolančanih fragmenata RNA, poznatih pod imenom epigenetički aktivirane male interferirajuće RNA (eng. epigenetically activated small interfering RNA, easiRNA), čija prisutnost dovodi do utišavanja uz njih vezanih lokusa. Okidač za početak stvaranja easiRNA koje dovode do utišavanja retrotranspozona je vezanje miRNA (eng. microRNA) na mjesto vezanja početnice u retrotranspozonu. To zatim privlači RNA polimerazu IV, za biljke karakterističnu polimerazu koja sudjeluje u epigenetičkom utišavanju sekvenci u genomu. Ona stvara jednolančani (ss) RNA transkript iz retrotranspozona, na koji zatim djeluje RNA-ovisna RNA polimeraza 2 (RDR2) te stvara dvolančanu (ds) RNA. Tako nastalu dvolančanu RNA procesuira dicer-like protein 1 (DCL1), enzim koji cijepa dsRNA i pre-microRNA u easiRNA i microRNA. Nastala easiRNA se veže na argonaut protein AGO4. Uz pomoć RNA polimeraze V, još jedne RNA polimeraze specifične za biljke, metiltransferaze DRM2 (eng. domains rearranged methyltransferase 2), te nekoliko dodatnih faktora za remodeliranje kromatina i proteina koji vežu i stabiliziraju metiliranu DNA, AGO4 dovodi do *de novo* metilacije DNA u biljaka. (Law i Jacobsen, 2010).



**Slika 3.** Model RNA-vođene DNA metilacije. Preuzeto od: Law i Jacobsen, 2010.

### 3. Genomska doza

Brojanje kromosoma u stanici ključno je u svih organizama. Prekomjeren broj kopija određenog gena (promjena genske doze) može uzrokovati mnogobrojne fenotipske promjene u organizmu te u određenim slučajevima dovesti do smanjene vijabilnosti i reproduktivne sposobnosti. Zato su živi organizmi razvili načine brojanja kromosoma kako bi osigurali da svaka stanica nakon diobe dobije odgovarajući broj kopija svakog kromosoma. Isto tako, brojanjem kromosoma se osigurava prepoznavanje nevijabilnih stanica u ranim fazama te njihovo uklanjanje iz organizma ili okoliša (ScienceDaily, 2018).

#### 3.1. Poliploidija

Poliploidija je fenomen pri kojem organizam ima više od dva homologna seta kromosoma. Kod životinja, poliploidija je u većini slučajeva smrtonosna. S druge strane, u biljaka je poliploidija puno češća pojava, posebno u biljaka cvjetnica (Angiospermae), gdje preko 70% vrsta pokazuje znakove rasta razine ploidije u svojoj evolucijskoj povijesti (Meyers i Levin, 2006). Događaji poliploidizacije se također povezuju sa specijacijskim događajima u biljaka. Novonastali poliploidi su iznimno reproduktivno izolirani od svojih predaka reproduktivnom barijerom poznatom kao triploidna barijera (eng. triploid block) (Borges i sur., 2018).

### 3.2. Triploidna barijera

Triploidna barijera javlja se prilikom pokušaja križanja biljaka koje se razlikuju u razini ploidije. Barijera se uspostavlja u endospermu, tkivu koje okružuje biljni embrio i služi kao spremište hranjivih tvari za biljku u razvoju (Borges i sur., 2018). Endosperm nastaje spajanjem jedne spermalne jezgre iz peludnog zrnca s binuklearnom središnjom stanicom ženskog gametofita. Kada su biljke roditelji jednakog stupnja ploidije, u endospermu će omjer majčinskih i očinskih gena biti 2:1. Kada se biljke roditelji razlikuju u stupnju ploidije, taj omjer je narušen, što dovodi do kolapsa endosperma i nastanka većinom nevijabilnog sjemena.

Budući da je nakupljanje easiRNA ovisno o dozi, pretpostavljeno je da bi ih biljke mogle koristiti kao zamjenu za kromosome te, preko brojanja relativnih omjera easiRNA majčinskog i očinskog podrijetla, doći do omjera majčinskih i očinskih gena. Uz to, prirodne varijacije u broju easiRNA unutar jedinke bi objasnile kako je ipak moguće da neke jedinke s roditeljima različite ploidije izbjegnu kolaps endosperma te na kraju dovedu do stvaranja nove vrste (ScienceDaily, 2018).

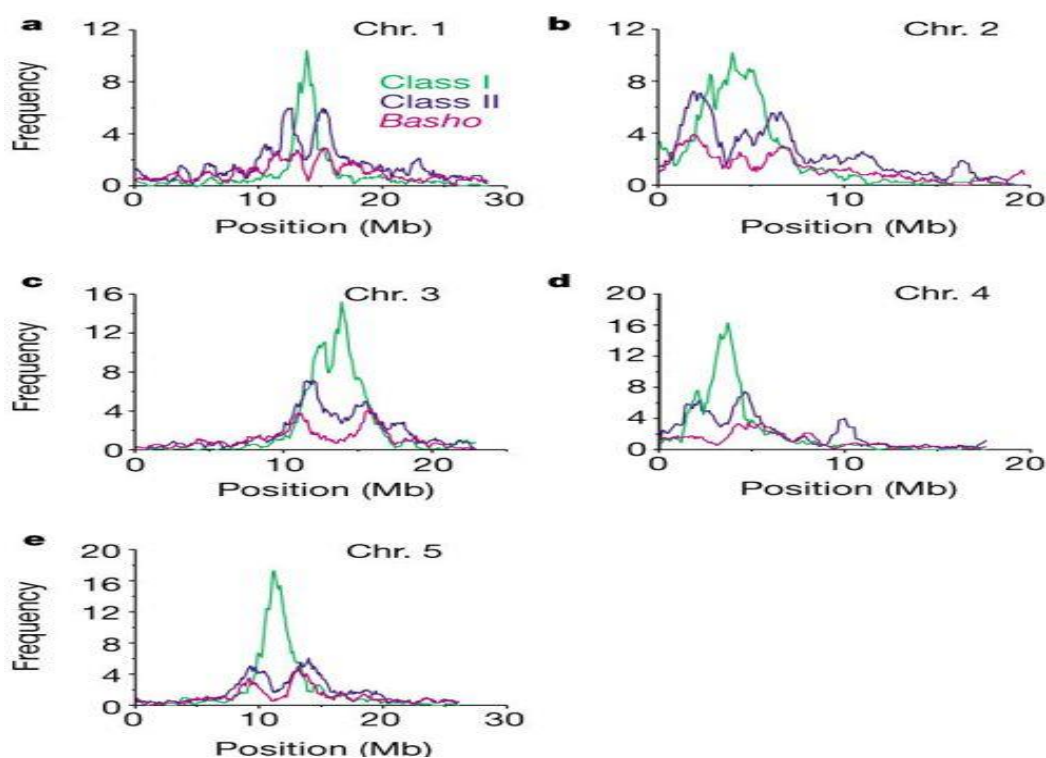
## 4. *Arabidopsis thaliana*

Uročnjak (lat. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) je jednogodišnja cvjetnica iz porodice *Brassicaceae*. Inače korov bez komercijalne vrijednosti, uročnjak je najvažniji modelni organizam u biljnoj molekularnoj genetici. Jednostavnost uzgoja, kratko generacijsko vrijeme i jednostavnost transformacije (tehnika ‘‘floral dip’’) su samo neke od karakteristika koje čine *A. thaliana* pogodnim modelnim organizmom. Uz to, činjenica da je uročnjak diploidan te da ima jedan od najmanjih genoma među biljkama čini ga pogodnim za genetičko mapiranje i sekvenciranje (*A. Thaliana* je prva biljka kojoj je u potpunosti sekvenciran genom) (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).



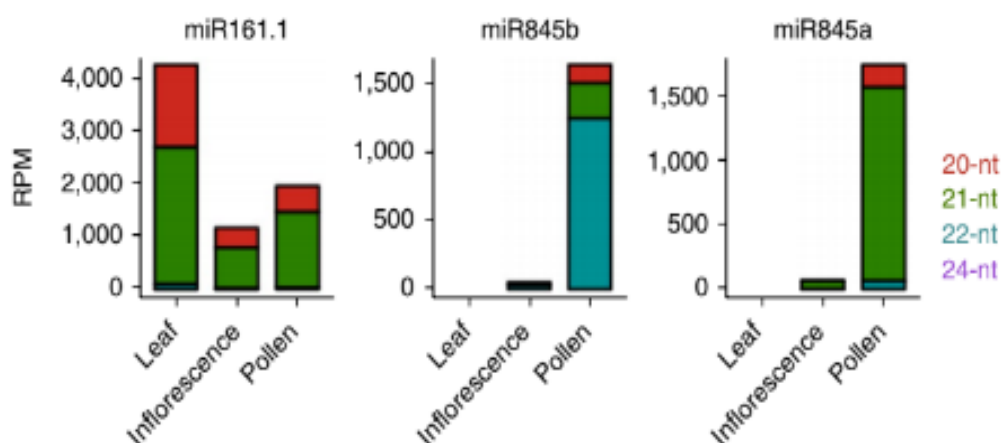
#### 4.1. Genom *A. thaliana*

Genom *A. thaliana* se sastoji od oko 135 Mbp sadržanih u pet kromosoma. Smatra se da barem 10% genoma otpada na transpozone. Retrotranspozoni se pojavljuju u manjem broju kopija nego u biljaka s većim genomima, te su primarno koncentrirani oko centromera (Le i sur., 2015) (**Slika 4**). Te regije kromosoma su relativno siromašne genima te nisu podložne rekombinaciji u jednakoj mjeri kao i ostatak kromosoma. Uz to, centromere su visoko metilirane i heterokromatizirane regije, što znači da su transpozoni sadržani u njima većinom utišani (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).



**Slika 4.** Položaji pokretnih genetičkih elemenata na kromosomima *A. thaliana* prikazani u intervalima od 100 kb. Retrotranspozoni su prikazani u zelenoj boji. Preuzeto od: The Arabidopsis Genome Initiative, 2000.

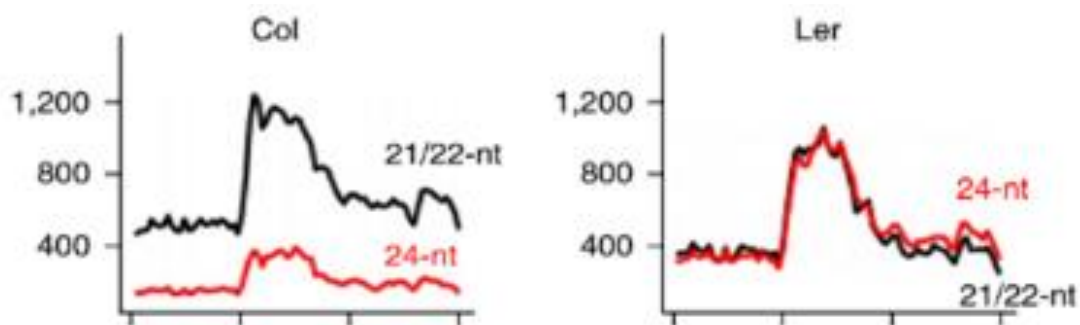
Od posebne zanimljivosti su LTR retrotranspozoni iz porodica *gypsy* i *copia*, koji su izvoriste većine easiRNA u peludnim zrnima *A. thaliana*. miRNA zadužene za pokretanje procesa stvaranja easiRNA iz *gypsy* i *copia* retrotranspozona u peludi *A. thaliana* su miR845a i miR845b. One se preferencijalno eksprimiraju u polenu (**Slika 5.**) te se vežu na 18. nukleotidnu poziciju u LTR retrotransponu, u mjestu vezanja početnice (Borges i sur., 2018).



**Slika 5.** Preferencijalna ekspresija miR845 porodice u peludi. Preuzeto od: Borges i sur., 2018.

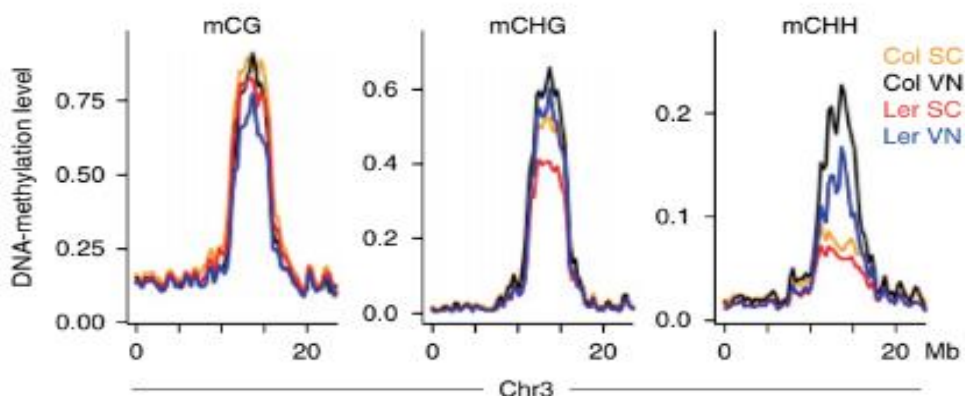
#### 4.2. Uspostava triploidne barijere u *A. thaliana*

Kako bi se dokazala povezanost miR845 i utišavanja pokretnih genetičkih elemenata, uspoređivana je pelud različitih linija *A. thaliana*. Kao kontrola divljeg tipa služila je linija Col-0 (Columbia). Linija Ler-0 (Landsberg), u kojoj je MIR845a u potpunosti deletiran, a MIR845b sadrži točkastu mutaciju, je bila izvor informacija o stanju transkriptoma kada su miR845 smanjeno aktivne (**Slika 6.**). Eksperimentima je pokazano da su 24-nukleotidni siRNA transkripti pokretnih genetičkih elemenata viši u liniji Ler-0 u kojoj su MIR845 geni utišani ili deletirani te da je u toj liniji manje 21/22- nukleotidnih easiRNA koje potječu od retrotranspozona koji su mete miR845 u odnosu na Col-0 liniju (Borges i sur., 2018).



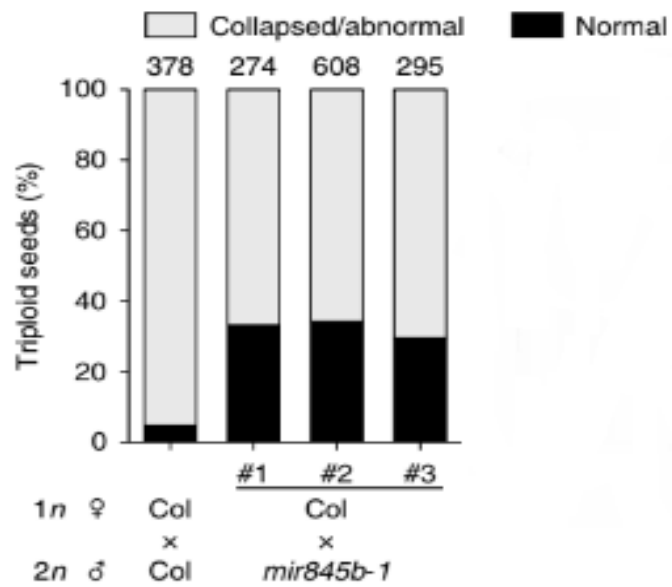
**Slika 6.** Količine miR845b-ovisnih easiRNA u polenu divljeg tipa linija Col-0 i Ler-0. Prilagođeno na temelju: Borges i sur., 2018

Budući da je easiRNA povezana s *de novo* metilacijom u biljaka, to jest s aktivnošću RNA-ovisne DNA polimeraze, uspoređivan je metilacijski status DNA u peludi sa smanjenom aktivnošću miR845 i u peludi gdje su te miRNA normalno aktivne. Rezultati su pokazali da je DNA u peludi Ler-0 linije hipometilirana, posebno u području centromera, što potvrđuje ranije nalaze o položaju retrotranspozona na kromosomima *A. thaliana* i ovisnost procesa nastanka easiRNA s procesima *de novo* metilacije u biljaka. Međutim, ti rezultati vrijede jedino za vegetativnu jezgru peludnog zrna (**Slika 7.**). U spermalnim stanicama peludnog zrna metilacijski status je jednak u obje promatrane linije te je vrlo nizak. To je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala da putevi RNA-ovisne DNA metilacije nisu aktivni u spermalnim stanicama polena (Borges i sur., 2018).



**Slika 7.** Prirodne varijacije u stupnju metiliranosti DNA u peludnim jezgrama linija Col-0 i Ler-0 (SC-spermalne jezgre; VN-vegetativne jezgre. Preuzeto od: Borges i sur., 2018

Daljni pokusi su također pokazali da se easiRNA u peludi nakupljaju ovisno o genomskoj dozi. U tu svrhu su korišteni Col-0 mutanti u kojima je ekspresija miR845b bila smanjena za otprilike pola. Pokazano je da je u tim mutantima količina easiRNA mnogo manja nego u divljem tipu Col-0 linije te slična količinama u divljem tipu Ler-0. Također je pokazano da easiRNA imaju važnu ulogu u uspostavljanju triploidne barijere u endospermu (**Slika 8.**). Naime, kada se sjeme divljeg tipa Col-0 oprašiti s peludi mutantnog Col-0 (osd1 mutanti, u kojima izostaje druga mejotska dioba te su stoga gamete diploidne), većina sjemena (95%) je nevijabilno, što je konzistentno s prijašnjim istraživanjima o vijabilnosti sjemena nastalog križanjem diploidne majčinske i tetraploidne očinske biljke. Nasuprot tome, križanje sjemena divljeg tipa Col-0 s peludi dvostrukog mutanta Col-0 (osd1;mir845b mutant; izostaje druga mejotska dioba ali je smanjena ekspresija miR845b) dovodi do puno manje stope nevijabilnog sjemena (65%) (Borges i sur., 2018).



**Slika 8.** Omjeri vijabilnog i nevijabilnog sjemena prilikom križanja sjemena divljeg tipa Col-0 s nereduciranim polenom s ili bez smanjene ekspresije miR845b. Prilagođeno na temelju: Borges i sur., 2018.

## 5. Literatura

- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Borges, F., Parent, J. S., van Ex, F., Wolff, P., Martínez, G., Köhler, C., & Martienssen, R. A. (2018). Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage responses in *Arabidopsis*. *Nature Genetics*, **50**, 186-192.
- Goulet, B. E., Roda, F., & Hopkins, R. (2017). Hybridization in Plants: Old Ideas, New Techniques. *Plant Physiology*, **173**, 65–78.
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews. Genetics*, **11**, 204–220.
- Le, T. N., Miyazaki, Y., Takuno, S., & Saze, H. (2015). Epigenetic regulation of intragenic transposable elements impacts gene transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, **43**, 3911–3921.
- Meyers, L. A., & Levin, D. A. (2006). On the abundance of polyploids in flowering plants. *Evolution*, **60**, 1198-1206.
- Vicient, C. M., & Casacuberta, J. M. (2017). Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. *Annals of Botany*, **2**, 195-207.
- Zhang, L., Yan, L., Jiang, J., Wang, Y., Jiang, Y., Yan, T., & Cao, Y. (2014). The structure and retrotransposition mechanism of LTR-retrotransposons in the asexual yeast *Candida albicans*. *Virulence*, **5**, 655–664.
- ScienceDaily. <https://www.sciencedaily.com/releases/2018/01/180118142540.htm>. Preuzeto 27. kolovoza 2018.

## 6. Sažetak

Nizom istraživanja na *Arabidopsis thaliana* i drugim biljnim modelnim organizmima utvrđeno je da se s očinske strane triploidna barijera uspostavlja nakupljanjem easiRNA, čija je relativna količina ovisna o genomskoj dozi. U tome važnu ulogu igraju miRNA, to jest specifično miR845a i miR845b, koje su visoko očuvane u većini biljnih porodica, koje stupaju u interakciju s mjestom vezanja početnice LTR retrotranspozona te služe kao okidač za sintezu easiRNA.

Činjenica da prilikom križanja jedinki divljeg tipa i nereduciranih mutanata postoji mala količina vijabilnog sjemena ukazuje na to da postoje prirodne varijacije u količini miR845 u populaciji koje omogućuju da događaji poliploidizacije u prirodi dovedu do specijacije i stvaranja novih biljnih vrsta. Isto tako, činjenica da postotak smanjenja aktivnosti miR845 ne korelira direktno s postotkom vijabilnog sjemena ukazuje na postojanje drugih, još neistraženih puteva uspostavljanja triploidne barijere te da samo djelovanje miR845 nije dovoljno kako bi se uspostavila triploidna barijera.

## 7. Summary

For the longest time, the mechanisms preventing the crossbreeding of certain plant species eluded us. However, a wealth of research conducted in the recent years has shed substantial light on the topic. It has been concluded that the triploid block on the paternal side is established via a kind of counting of chromosomes. An important role in this counting is played by miRNA (specifically miR845a and miR845b in *Arabidopsis thaliana*), which triggers the dose-dependent accumulation of easiRNA (epigenetically-activated small interfering RNA).

The counting process is conducted in the endosperm of the seed. Owing to the way it is formed, the ratio of maternal to paternal genetic material in the endosperm should be 2:1. If this ratio is disturbed (e.g. an excess of paternal genetic material is detected), the seed aborts.

However, these easiRNA play only a small part in establishing the triploid block. This is demonstrated in part by the small amount of wild type seeds that remain viable despite the triploid block being in place. What's more, a large part of seeds remain non-viable, even when the activity of miR845 is downregulated. This could in part be due to the role of maternal small RNAs, whose part in establishing the triploid block is still poorly understood.